

Sains Malaysiana 41(12)(2012): 1587–1593

Penghasilan Hidrogen oleh Bakteria *Rhodobacter sphaeroides* NCIMB 8253 (Hydrogen Production via *Rhodobacter sphaeroides* NCIMB 8253)

NOR ZAWANAH AB. HAMID, JAMALIAH MD JAHIM*, NURINA ANUAR & SAHAID KHALID

ABSTRAK

Hidrogen merupakan sumber tenaga yang boleh diperbaharui dan efektif. Hidrogen boleh dihasilkan melalui fotofermentasi oleh bakteria ungu tanpa sulfur seperti *Rhodobacter sphaeroides* disebabkan kebolehan yang tinggi dalam menghasilkan hidrogen dalam keadaan anaerobik. Dalam kajian ini, bakteria dieram di dalam botol serum 100 mL dalam keadaan anaerobik. Kajian ini bertujuan untuk memaksimumkan penghasilan hidrogen oleh *Rhodobacter sphaeroides* NCIMB 8253 yang melibatkan kajian mengenai inokulum dalam keadaan aerobik dan anaerobik, kesan pH awal dan kesan keamatan cahaya terhadap penghasilan hidrogen. Daripada uji kaji yang dilakukan, didapati bahawa inokulum yang dieram pada keadaan anaerobik menghasilkan hidrogen tertinggi iaitu 220.5 mL/g substrat. pH 7 adalah pH yang paling sesuai digunakan untuk penghasilan hidrogen. Keamatan cahaya 5,000 lux adalah nilai optimum yang dapat memberikan penghasilan hidrogen tertinggi iaitu 80.21 mL hidrogen dengan hasil hidrogen 401.04 mL/g substrat. Penghasilan hidrogen didapati semakin menurun pada keamatan cahaya yang lebih tinggi daripada 5,000 lux.

Kata kunci: Bakteria fotosintetik; hidrogen, *Rhodobacter sphaeroides*

ABSTRACT

Hydrogen is a renewable source of energy and is effective. Hydrogen can be produced by photofermentation by purple non sulfur bacteria such as *Rhodobacter sphaeroides*, due to the high ability to produce hydrogen in anaerobic conditions. In this study, bacteria were incubated in 100 mL serum bottles in anaerobic conditions. The aims of this study were to maximize the hydrogen production of *Rhodobacter sphaeroides* NCIMB 8253 which involves the study of the inoculums in aerobic and anaerobic conditions, and to determine the effect of initial pH and the effect of light intensity on hydrogen production. From the experiments, it was found that inoculums in anaerobic conditions produced the highest of hydrogen yield 220.5 mL/g substrate. pH 7 is the most suitable pH for the hydrogen production. Light intensity of 5,000 lux is the optimum value that would give the highest hydrogen production at 80.21 mL and hydrogen yield 401.04 mL/g substrate. Hydrogen production declined at light intensities higher than 5,000 lux.

Keywords: Hydrogen; photosynthetic bacteria; *Rhodobacter sphaeroides*

PENDAHULUAN

Hidrogen merupakan bahan api masa hadapan kerana ia boleh diperbaharui dan tidak mencemarkan alam sekitar (Wu et al. 2012). Proses biohidrogen dioperasikan pada suhu ambien dan tekanan atmosfera yang menyebabkan kurang tenaga intensif dan lebih mesra alam berbanding proses termokimia dan elektrokimia. Secara umumnya, biohidrogen boleh dihasilkan melalui bakteria obligat anaerob, fakultatif anaerob, aerobik dan bakteria fotosintetik. Bakteria fotosintetik mempunyai potensi yang baik berbanding mikrob lain disebabkan oleh penukaran substrat yang tinggi kepada produk hasil, berkeupayaan menggunakan jarak gelombang cahaya yang luas dan keupayaan menggunakan substrat organik (daripada bahan-bahan buangan) untuk penghasilan biohidrogen yang seterusnya membantu dalam proses bioremediasi (Akkerman et al. 2002).

Parameter fizikokimia boleh mempengaruhi penghasilan biohidrogen oleh bakteria fotosintetik ungu tanpa sulfur. Beberapa kajian telah dijalankan oleh

penyelidik untuk mengenal pasti kesesuaian proses serta mengoptimumkan parameter yang berlainan (Basak & Das 2007). Antara parameter yang dikenal pasti memberi kesan terhadap penghasilan hidrogen ialah sumber karbon dan nitrogen (Kars et al. 2009), nilai pH (Tao et al. 2008), suhu dan keamatan cahaya (Basar et al. 2007).

Dalam uji kaji ini kesan keadaan inokulum dalam keadaan aerobik dan anaerobik, kesan pH awal dan kesan keamatan cahaya yang berbeza telah dikaji untuk melihat keupayaan bakteria *Rhodobacter sphaeroides* NCIMB 8253 dalam menghasilkan gas hidrogen serta memaksimumkan penghasilan gas hidrogen. Daripada uji kaji yang dilakukan didapati bahawa parameter ini telah memberi kesan secara langsung terhadap penghasilan gas hidrogen serta meningkatkan kadar penghasilan gas.

BAHAN DAN KAEDAH

Bakteria dieram pada medium agar selama 3 hari. Dua peringkat inokulum dilakukan dengan memindahkan

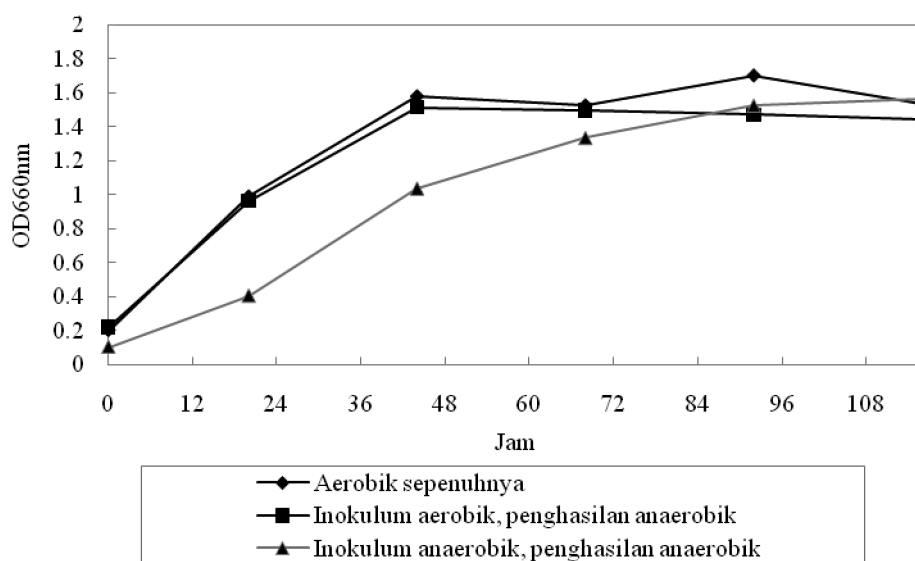
bakteria dari piring agar ke medium pertumbuhan cecair iaitu medium minimum Biebl dan Pfenning (Eroglu et al. 1999) selama 3 dan 1 hari. Asid malik (7.5 mM) sebagai sumber karbon dan 10 mM sodium glutamat sebagai sumber nitrogen untuk medium pertumbuhan. Inokulum (10% v/v) dipindahkan ke medium penghasilan yang mengandungi 15 mM asid malik dan 2 mM sodium glutamat. Bakteria dieram pada suhu 30°C dengan keamatan cahaya 4.5 klux dalam keadaan anaerobik. Ketumpatan sel bakteria dikira menggunakan spektrofotometer pada jarak gelombang 660 nm. Akaun gas yang terhasil pada setiap uji kaji diukur dengan menggunakan picagari manakala komposisi gas hidrogen dianalisis menggunakan kromatografi gas (GC-8A, Shimadzu, Jepun) yang dilengkapi dengan pengesan konduktiviti terma. Suhu operasi pada relau dan pengesan adalah 50°C, 150°C dan helium digunakan sebagai gas pembawa.

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

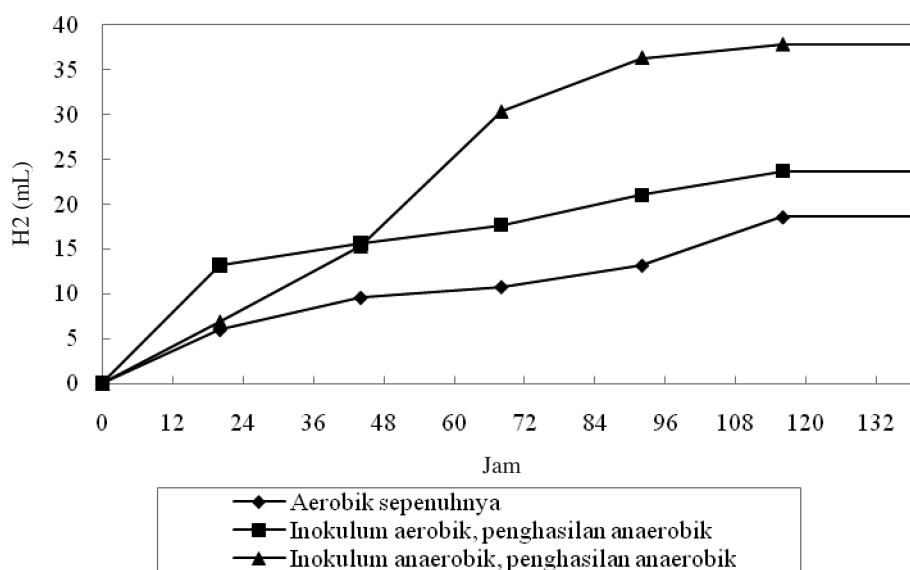
KAJIAN KEADAAN INOKULUM YANG BERBEZA

R. sphaeroides mempunyai keupayaan metabolik yang fleksibel seperti fotoheterotrofi, respirasi aerobik atau respirasi anaerobik dan fermentasi (Akkose et al. 2009). Dalam kajian ini, dua keadaan inokulum yang berbeza dikaji iaitu pada keadaan aerobik dan anaerobik untuk melihat kesan terhadap pertumbuhan bakteria dan penghasilan gas hidrogen. Ini kerana bakteria *R. sphaeroides* adalah bakteria fakultatif anaerobik yang boleh hidup dalam keadaan aerobik dan anaerobik. Kajian ini melibatkan inokulum aerobik dan medium penghasilan anaerobik; inokulum anaerobik dan medium penghasilan anaerobik serta aerobik sepenuhnya.

Rajah 1 menunjukkan ketumpatan optik bagi lengkok pertumbuhan yang menggunakan inokulum dalam keadaan aerobik lebih tinggi berbanding dalam keadaan anaerobik. Kultur bakteria juga lebih keruh dalam keadaan aerobik berbanding anaerobik kerana penggunaan inokulum dalam keadaan aerobik menggalakkan pertumbuhan sel. Namun begitu, penghasilan gas hidrogen adalah rendah jika inokulum dalam keadaan aerobik digunakan (Rajah 2). Ini disebabkan oleh inokulum yang kepekatan selnya tinggi akan mengurangkan penyerapan dan penyerakan cahaya oleh kultur (Koku et al. 2003) sekaligus merencatkan penghasilan gas hidrogen oleh bakteria. Penghasilan gas hidrogen dalam kultur aerobik disebabkan oleh pengambilan oksigen semasa proses respirasi sel. Ini dapat diterangkan melalui persaingan antara pengambilan elektron semasa proses respirasi dan pengambilan nitrogen. Aliran elektron utama ke dalam rantai respirasi menyebabkan tindakan ketidakaktifan berbalik enzim nitrogenase. Oleh itu, bakteria boleh menghasilkan hidrogen selepas peringkat penyingkiran penghad iaitu oksigen semasa respirasi (Akkose et al. 2009). Rajah 2 menunjukkan bahawa inokulum dalam keadaan anaerobik menghasilkan hidrogen dua kali ganda lebih tinggi daripada inokulum dalam keadaan anaerobik. Ini kerana dalam keadaan aerobik, kehadiran oksigen akan mengganggu pengambilan nitrogen biologi dengan menghalang sintesis nitrogenase dan menyebabkan aktiviti enzim nitrogenase dalam *R. sphaeroides* sebagai penghad berbalik. Ini akan mengurangkan penghasilan hidrogen kerana penghasilan hidrogen dimangkinakan oleh enzim nitrogenase. Jadual 1 menunjukkan data bagi pH akhir, jumlah gas, jumlah hidrogen dan hasil hidrogen per g asid malik bagi eksperimen yang dikaji. Hasil hidrogen tertinggi diperoleh dengan inokulum dan medium penghasilan dieram dalam keadaan anaerobik iaitu 189 mL/g.



RAJAH 1. Profil pertumbuhan bakteria melawan masa



RAJAH 2. Profil penghasilan gas hidrogen melawan masa

JADUAL 1. Data bagi keadaan inokulum yang berbeza

	pH akhir	Jumlah gas (mL)	H ₂ (mL)	Y _{H₂/A. malik} (mL/g)
Aerobik sepenuhnya	8.25	31.00	18.60	93.00
Inokulum aerobik, penghasilan anaerobik	7.72	39.50	23.70	118.50
Inokulum anaerobik, penghasilan anaerobik	7.63	63.00	37.80	189.00

KESAN pH AWAL TERHADAP PENGHASILAN HIDROGEN

Nilai pH yang berbeza pada medium pengkulturan menentukan bentuk ion dalam tapak aktif dan aktiviti enzim dengan nilai pH bagi medium pengkulturan akan memberikan kesan tindak balas biokimia (Wang et al. 2011). Kesan pH awal terhadap pertumbuhan bakteria *R. sphaeroides* NCIMB 8253 dan penghasilan gas hidrogen dikaji menggunakan lima nilai pH berbeza iaitu pH 4, 6, 7, 8 dan 10 dengan kepekatan asid malik 15 mM (Jadual 2). Semasa uji kaji dijalankan, suhu dan keamatan cahaya dimalarkan pada 30°C dan 4.5 klux manakala pH tidak dikawal semasa eksperimen dijalankan. Rajah 4 menunjukkan profil pH melawan masa bagi ke lima-lima nilai pH yang dikaji. Didapati bahawa tiada pertumbuhan sel pada pH 4 serta tiada penghasilan gas hidrogen (Rajah 5). Ini menunjukkan bahawa bakteria ini tidak boleh hidup pada nilai pH yang terlalu rendah. Profil pertumbuhan bagi pH 6, 8 dan 10 seperti dalam Rajah 3 menunjukkan lengkok pertumbuhan bagi ketiga-tiga nilai pH hampir sama serta masa lag untuk penghasilan gas hidrogen iaitu 27 jam (Rajah 5). Bagi pH 7 pula, fasa lag untuk penghasilan gas hidrogen adalah lebih pendek iaitu 6 jam.

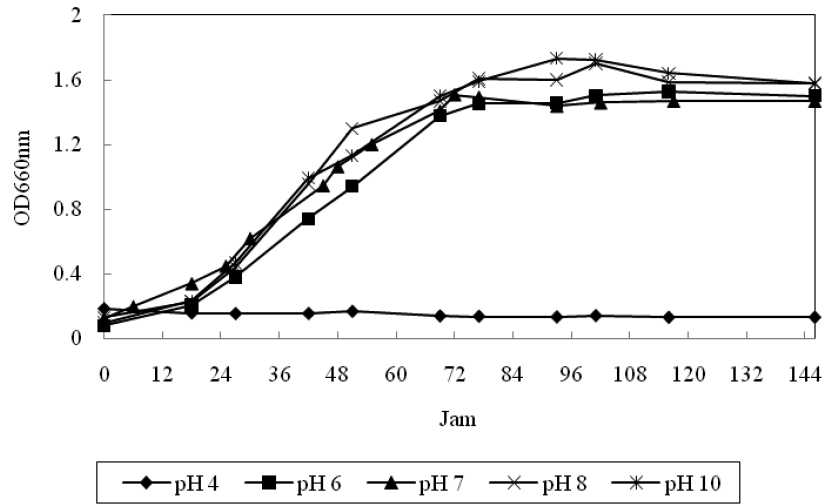
Rajah 5 menunjukkan pH 7 menghasilkan gas hidrogen tertinggi iaitu sebanyak 46.68 mL ($Y_{H_2/Malate} = 233.41 \text{ mL/g}$) berbanding dengan pH lain. Nilai pH yang lebih tinggi daripada pH 7 akan mengurangkan penghasilan gas hidrogen disebabkan oleh penghad nitrogenase dan aktiviti

lain bakteria (Fang et al. 2005). Bakteria *R. sphaeroides* NCIMB 8253 boleh menghasilkan hidrogen pada nilai pH 6, 7, 8 dan 10 dan mencapai nilai yang optimum pada pH 7.

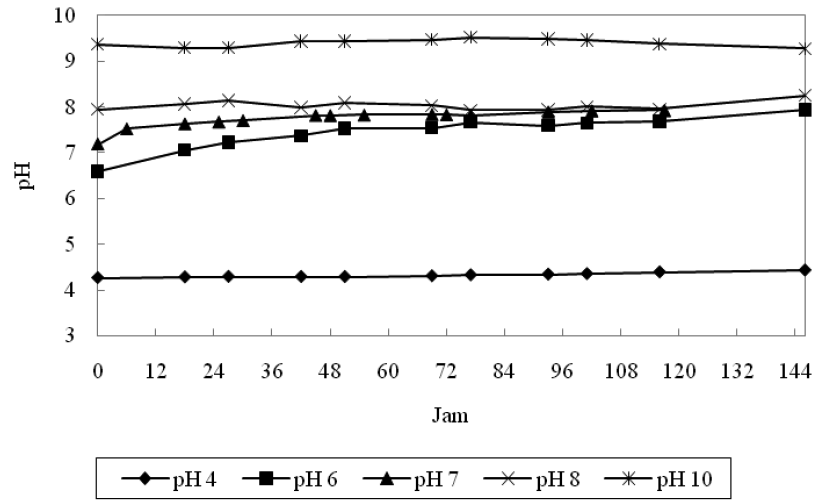
Nilai pH 7 merupakan nilai pH yang telah dicadangkan dalam beberapa kajian sebagai nilai pH yang paling sesuai untuk pertumbuhan sel dan penghasilan gas hidrogen oleh *R. sphaeroides* dan *Rhodobacter capsulatus* (Zabut et al. 2006). Tao et al. (2008) telah mengkaji kesan lapan pH awal yang berbeza dalam julat pH 5-10 ke atas penghasilan gas hidrogen dan pertumbuhan sel *R. sphaeroides* strain ZX-5. Daripada uji kaji yang beliau jalankan didapati bahawa pH 7 adalah nilai pH yang paling sesuai untuk pertumbuhan sel. Ini kerana apabila nilai pH mencapai pH 7, sel akan mula bertumbuh dan mula menghasilkan gas hidrogen. Terdapat peningkatan nilai pH yang kecil pada 69 jam pertama bagi pH 6 hingga pH 10 dan selepas itu nilai pH hampir malar. Peningkatan nilai pH semasa fasa eksponen ini adalah disebabkan oleh penggunaan asid dan glutamat dalam medium oleh bakteria (Basar et al. 2007; Kars et al. 2009). Manakala penggunaan nilai pH awal yang terlampau tinggi pula akan menyekat penghasilan gas hidrogen.

KESAN KEAMATAN CAHAYA YANG BERBEZA TERHADAP PENGHASILAN HIDROGEN

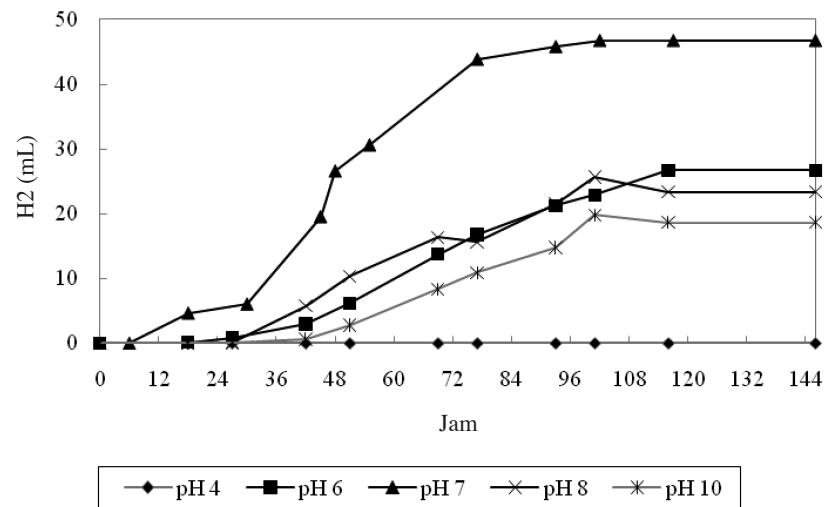
Salah satu daripada parameter yang mempengaruhi prestasi fermentasi foto ialah keamatan cahaya. Dalam uji kaji ini, lima keamatan cahaya yang berbeza dikaji iaitu



RAJAH 3. Profil pertumbuhan bakteria melawan masa



RAJAH 4. Profil pH melawan masa semasa proses fermentasi foto



RAJAH 5. Profil penghasilan hidrogen bagi pH awal medium yang berbeza

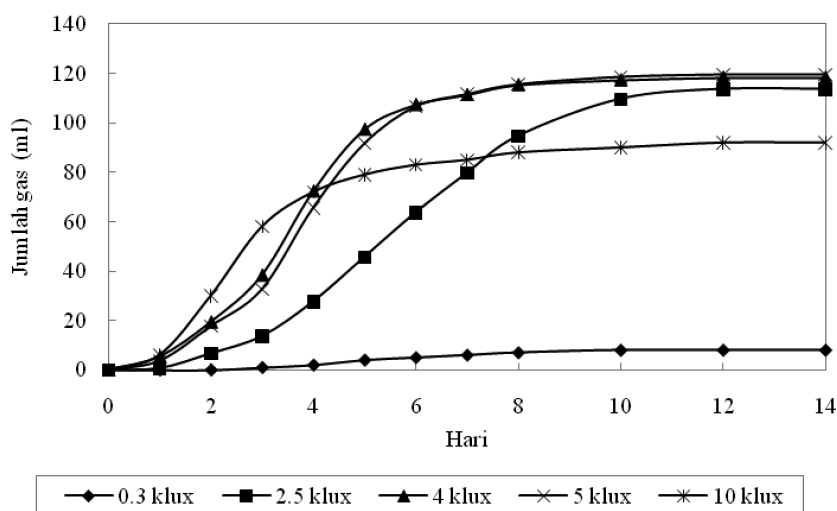
0.3, 2.5, 4, 5 dan 10 klux. Rajah 6 menunjukkan profil penghasilan gas bagi kelima-lima keamatan cahaya yang dikaji. Manakala Jadual 3 menunjukkan data uji kaji bagi kesan keamatan cahaya. Didapati bahawa penghasilan gas hidrogen meningkat dengan peningkatan keamatan cahaya dari 0.3 klux sehingga 5 klux dengan hasil hidrogen iaitu 401.04 mL/g. Selepas daripada takat ini, didapati bahawa penghasilan hidrogen semakin merosot. Ini disebabkan oleh keamatan cahaya yang tinggi akan memberikan lebih tenaga ATP dan tenaga penurun kepada sistem fotosintetik. Walau bagaimanapun, apabila keamatan cahaya menjadi

tepu, sistem fotosintetik mendapat ATP dan Fd_{red} berlebihan berbanding kapasiti nitrogenase (Asada & Miyake 1999). Aktiviti nitrogenase dan penghasilan hidrogen menurun apabila keamatan cahaya mencapai takat tepu. Sasikala et al. (1991) dan Li et al. (2009) juga menjalankan uji kaji dan mendapati bahawa penghasilan hidrogen menjadi tepu pada keamatan cahaya 5,000 lux.

Pertambahan keamatan cahaya akan merangsang penghasilan dan kadar penghasilan gas hidrogen, sebaliknya pertambahan keamatan cahaya ini memberikan kesan buruk kepada kecekapan penukaran cahaya (Barbosa

JADUAL 2. Data nilai pH awal yang berbeza bagi penghasilan hidrogen

pH awal	pH akhir	Jumlah gas (mL)	H ₂ (mL)	Y _{H₂/Malate} (mL/g)	Kadar penghasilan H ₂ (l/l/j)
4	4.43	0.00	0.00	0	0
6	7.94	55.00	26.69	133.44	0.0018
7	7.93	64.33	46.68	233.41	0.0032
8	8.25	45.50	23.36	116.81	0.0016
10	9.28	36.00	18.63	93.17	0.0013



RAJAH 6. Profil jumlah gas yang terhasil melawan masa

JADUAL 3. Kesan keamatan cahaya yang berbeza terhadap penghasilan gas hidrogen

Cahaya (klux)	Gas (mL)	H ₂ (mL)	Y _{H₂/A.malik} (mL/g)
0.3	8	1.75	8.73
2.5	114	59.42	297.11
4	118	78.25	391.25
5	120	80.21	401.04
10	92	43.33	216.65

et al. 2001). Kondo et al. (2002) mendapati bahawa pengurangan pigmen mutan oleh *R. sphaeroides* MTP4 menghasilkan gas hidrogen dengan lebih baik di bawah keamatan cahaya tinggi. Berdasarkan keputusan Basar et al. (2007), peningkatan keamatan cahaya sehingga 270 W/m² meningkatkan kadar penghasilan hidrogen maksimum kepada 33 mL/j kultur. Manakala Quanguo et al. (2007) telah mengkaji kesan keamatan cahaya terhadap pengeluaran hidrogen oleh *Rhodobacter sphaeroides* 1.1737 dan mendapati bahawa keamatan cahaya meningkatkan kadar penghasilan gas hidrogen. Kadar penghasilan gas hidrogen meningkat apabila keamatan cahaya melebihi 1,000 luks manakala aktiviti bakteria meningkat dengan drastik. Kadar pengeluaran gas hidrogen adalah maksimum pada 1,600 luks. Ini menunjukkan bahawa pengaruh aktiviti bagi penghasilan gas hidrogen akan merosot apabila keamatan cahaya meningkat untuk satu kadar tertentu. Kesan keamatan cahaya ke atas kadar dan jumlah penghasilan gas hidrogen berkurang secara beransur-ansur dan penambahan keamatan cahaya seterusnya tidak memberi apa-apa kesan apabila keamatan cahaya mencapai satu nilai tepu. Ini menunjukkan bahawa keamatan cahaya merupakan parameter penting yang perlu diambil kira dalam memaksimumkan penghasilan hidrogen. Daripada uji kaji yang dilakukan menunjukkan keamatan cahaya 5,000 lux merupakan nilai optimum bagi penghasilan gas hidrogen bagi *R. sphaeroides* NCIMB 8253 iaitu 80.21 mL hidrogen/100 mL kultur dengan hasil hidrogen 401.04 mL/g substrat.

KESIMPULAN

Daripada keputusan uji kaji, didapati bahawa fermentasi bagi penghasilan hidrogen menggunakan bakteria fotosintetik ini perlu dilakukan dalam keadaan anaerobik sepenuhnya. Parameter penting lain seperti pH dan keamatan cahaya yang optimum perlu dititik beratkan dalam memaksimumkan penghasilan hidrogen. Dalam uji kaji ini pH 7 dan keamatan cahaya 5,000 lux merupakan nilai optimum yang perlu diambil kira semasa fermentasi dijalankan. Kajian ini merupakan kajian awal bagi penghasilan hidrogen menggunakan *R. sphaeroides* NCIMB 8253. Kajian susulan perlu dilakukan dengan mengambil kira parameter fizikokimia yang lain seperti kesan sumber karbon, sumber nitrogen dan unsur logam terhadap penghasilan hidrogen.

PENGHARGAAN

Penulis mengucapkan penghargaan kepada Kementerian Sains Teknologi dan Inovasi (MOSTI) di atas tajaan projek ini melalui 03-01-020SF0346.

RUJUKAN

Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J. & Wijffels, R.H. 2002. Photobiological hydrogen production: Photochemical efficiency and bioreactor design. *Int. J. Hydrogen Energy* 27: 1195-1208.

- Akkose, S., Gunduz, U., Yucel, M. & Eroglu I. 2009. Effects of ammonium ion, acetate and aerobic conditions on hydrogen production and expression levels of nitrogenase genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int. J. Hydrogen Energy* 34: 8818-8827.
- Asada, Y. & Miyake, J. 1999. Photobiological hydrogen production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(1): 1-6.
- Barbosa, M.J., Rocha, J.M.S., Tramper, J. & Wijffels, R.H. 2001. Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria. *Journal of Biotechnology* 85(1): 25-33.
- Basak, N. & Das, D. 2007. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: The present state of the art. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 31-42.
- Basar, U., Errol, I., Yokel, M., Genus, U. & Tucker, L. 2007. Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy* 32: 4670-4677.
- Eroglu, I., Aslan, K., Gunduz, U., Yucel, M. & Turker, L. 1999. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 70: 103-113.
- Fang, H.H.P., Liu, H. & Zhang, T. 2005. Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. *Int. J. Hydrogen Energy* 30: 785-793.
- Kars, G., Gunduz, U., Yucel, M., Rakhely, G., Kovacs, K.L. & Eroglu, I. 2009. Evaluation of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 and its hupSL deficient mutant using acetate and malate as carbon sources. *Int. J. Hydrogen Energy* 34: 2184-2190.
- Koku, H., Eroglu, I., Gunduz, U., Yucel, M. & Turker, L. 2003. Kinetics of biological hydrogen production by photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *Int. J. Hydrogen Energy* 28: 381-388.
- Kondo, T., Arakawa, M., Wakayama, T. & Miyake, J. 2002. Hydrogen production by combining two types of photosynthetic bacteria with different characteristics. *International Journal of Hydrogen Energy* 27(11-12): 1303-1308.
- Li, X., Wang, Y.H., Zhang, S.L., Chu, J., Zhang, M., Huang, M.Z. & Zhuang, Y.P. 2009. Enhancement of phototrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* ZX-5 using a novel strategy-shaking and extra-light supplementation approach. *International Journal of Hydrogen Energy* 34(24): 9677-9685.
- Quanguo, Z., Ruyan, Z., Junhe, Z. & Qunfa, Y. 2007. Influence of light intensity on hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* from swine manure wastewater. *International Journal of Global Energy Issues* 28(4): 382-388.
- Sasikala, K., Ramana, Ch. V. & Raghuvier, R.P. 1991. Environmental regulation for optimal biomass yield and photoproduction of hydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *International Journal of Hydrogen Energy* 16(9): 597-601.
- Tao, Y., He, Y., Wu, Y., Liu, F., Li, X., Zong, W. & Zhou, Z. 2008. Characteristics of a new photosynthetic bacterial strain for hydrogen production and its application in wastewater treatment. *Int. J. Hydrogen Energy* 33: 963-973.
- Wang, Y.Z., Liao, Q., Zhu, X., Li, J. & Lee, D.J. 2011. Effect of culture conditions on the kinetics of hydrogen production by photosynthetic bacteria in batch culture. *Int. J. Hydrogen Energy* 36: 14004-14013.

Wu, T.Y., Hay, J.X.W., Kong, L.B., Juan, J.C. & Jahim, J. 2012. Recent advances in reuse of waste material as substrate to produce biohydrogen by purple nonsulfur (PNS) bacteria. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 16(5): 3117-3122.

Zabut B, El-Kahlout K., Yucel, M., Gunduz, U., Turker, L. & Eroglu, I. 2006. Hydrogen gas production by combined systems of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 and *Halobacterium salinarum* in a photobioreactor. *Int J Hydrogen Energy* 31: 1553-62.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: jamal@eng.ukm.my

Diserahkan: 21 Oktober 2011

Diterima: 3 Ogos 2012

Jabatan Kejuruteraan Kimia dan Proses
Fakulti Kejuruteraan & Alam Bina
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor
Malaysia